

アーバスキュラー菌根菌共生遺伝子SIS1の機能解析

著者	前田 靖教
URL	http://hdl.handle.net/10236/00028949

アーバスキュラー菌根菌共生遺伝子 *SIS1* の機能解析

関西学院大学大学院理工学研究科
生命科学専攻武田研究室 前田靖教

【研究目的】アーバスキュラー菌根菌（以下、菌根菌）は陸上植物の約 80%の植物科と相利共生を行う糸状菌の一種で、宿主植物から光合成によって得られた糖などの炭素源を受け取る代わりに、菌根菌はリンをはじめとする無機栄養類や水分などを土壤中から幅広く吸収し、宿主植物に供給する相利共生を行っている。*Strigolactone Induced Small protein 1 (SIS1)* は植物ホルモンの一つであり菌根菌への共生として機能するシグナルストリゴラクトンによって誘導される 149 アミノ酸残基の低分子タンパク質をコードする遺伝子であり、共生の準備段階から共生中まで広く発現している。卒業研究では推定分泌シグナルが糸状菌で機能することを示し、宿主植物と菌根菌の境界に分泌されることで感染や共生器官である樹枝状体の形成に関与していることが推察された。菌根菌は様々な理由から、共生に関わる遺伝子の研究が植物の共生遺伝子に比べ遅れている。また、分泌シグナルを持つ低分子タンパク質は別のタンパク質と相互作用して機能する可能性が高いが、両共生体の境界に存在することから菌体自身に働くのか宿主植物に作用するのかは未解明である。そこで本研究の目的は、宿主植物に *SIS1* を発現させることで共生における機能解析を行い、共生相互作用に関わる分子機構を解明することである。

【実験方法】 *SIS1* が宿主植物へ作用する可能性を検証するため、ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)において *SIS1* を過剰発現する組換え体を作成し、宿主への菌根菌の感染率及び樹枝状体形成率、樹枝状体の形態比較などの表現型解析を行った。また *SIS1* 分泌シグナルによる機能への影響を調べるために、*SIS1* の分泌シグナルを欠損させた Δ *SIS1*、*SIS1* 配列の上流にミヤコグサの分泌シグナルを付加した SP-*SIS1*、 Δ *SIS1* に SP-*SIS1* 同様の分泌シグナルを付加した SP- Δ *SIS1* の三種類の過剰発現体を作製し、表現型解析を行った。*SIS1* 及び前述の三種類のコンストラクトにおける細胞内局在を調べるため、各 C 末端に蛍光タンパク質 Venus を付加してミヤコグサおよびタバコ(*Nicotiana benthamiana*)で発現させ、蛍光局在を調べた。

【実験結果と考察】 qRT-PCR により *SIS1* の過剰発現が確認できた個体では、菌根菌感染率が野生型に比べて有意に上昇した。 Δ *SIS1* 及び SP-*SIS1* の過剰発現体では感染率、樹枝状体形成率ともに野生型に比べ有意差はなかったが、SP- Δ *SIS1* ではどちらの表現型においても有意に上昇した。ミヤコグサ細胞内での局在解析では、 Δ *SIS1*-Venus では細胞質局在が見られたが、*SIS1*/SP-*SIS1*/SP- Δ *SIS1*-Venus ではアポプラスト領域で強い蛍光が見られた。また、タバコでの局在解析では、原形質分離下で *SIS1*/SP-*SIS1*/SP- Δ *SIS1*-Venus の蛍光領域が広がるのに対し、 Δ *SIS1*-Venus の蛍光領域は狭くなった。これは原形質分離によってアポプラスト領域の拡大と細胞質領域の縮小が起きたと考えられる。これらより *SIS1* が元来持つ分泌シグナルは、植物細胞内でも機能すると考えられる。また、*SIS1* や SP- Δ *SIS1* の過剰発現体で感染率や樹枝状体形成率の上昇など表現型の変化が見られたのに対し、同じく分泌された SP-*SIS1* ではそれらの表現型が見られないことから、分泌時にシグナル配列が取り除かれ、分泌シグナルの無い状態の *SIS1* が植物と菌境界のアポプラスト空間で機能すると考えられる。

【参考文献】

(1) Tsuzuki, S.. et al.. Mol Plant Microbe Interact. Apr;29(4):277-86 (2016)

(2) Silke. K.. et al..Current Biology. July;26:1204-09(2011)

|